

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02567

研究課題名(和文) 一細胞解析法を応用した小児腫瘍のCancer fluid biopsyの確立

研究課題名(英文) Cancer fluid biopsy for childhood malignancies using one cell analysis

研究代表者

檜山 英三(Hiyama, Eiso)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号：00218744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：広島大学に保存された小児腫瘍の初代培養細胞、凍結検体および血漿と、磁気ビーズの細胞濃縮装置にて採取した循環腫瘍細胞を対象にCell free biopsyを行った。一細胞解析でのマス質量分析であるセルロミクスではがん幹細胞は嫌気性解糖系が亢進し、ゲノミクスでは遺伝子変異は検出しえた。培養上清、血漿中のマーカー検索として、エクソームから予後関連microRNAを選別した。さらに、遊離DNAを用いた次世代シーケンサーやデジタルPCRで検索では、MYC遺伝子増幅、カテニン変異などの遺伝子変異の検出も可能であった。低侵襲で、診断、薬剤反応性や再発探索に有用なツールと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cancer liquid biopsy was performed on primary cultured cells, frozen specimens and plasma of pediatric tumors preserved in Hiroshima University Hospital and circulating tumor cells collected with magnetic beads cell concentrators. In single cell mass spectrometry (cellomics), anaerobic glycolysis was enhanced in cancer stem cells, and in single cell genomic mutations were detectable. Prognosis-related microRNAs were isolated from exosomes as a biomarker search in culture supernatant and plasma. Furthermore, it was also possible to detect gene mutations such as MYC gene amplification and catenin mutation by the next generation sequencing and digital PCR using cell free DNA. It was considered to be a useful tool for minimally invasive diagnosis, drug susceptibility and monitoring of recurrence.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌 細胞 組織 核酸 バイオテクノロジー 臨床

DNA 抽出後次世代シーケンサーで検討し、悪性度の高いがん細胞のバイオマーカーを一細胞解析から抽出した。一細胞解析(セロミクス)と一細胞ゲノム解析(ゲノミクス)：細胞株 24 株のがん幹細胞分画の一細胞解析である程度の分解能のあるピークを得る条件が確定した。この条件で、神経芽腫、腎芽腫、肝芽腫に特徴的な物質を抽出しがん幹細胞は嫌気性解糖系が亢進していた。ゲノミクスでは、一細胞ごとの遺伝子変異については検出可能であり、CTC の識別には有用は測定系が確立された。遺伝子発現は、アライメントは低いが特徴的な発現パターンをみいだせた。

3) 細胞株上清、血漿中のマーカー検索：血漿中 Cell Free DNA (cfDNA)を抽出し、標的の神経芽腫の MYCN 増幅 (図 2) 肝芽腫のカテニン (CTNNB1) 遺伝子変異の検出は可能で、カテニン (CTNNB1) 遺伝子変異のホットスポットの検出法も確立した。さらに培養上清と血漿中エクソームから microRNA を抽出し、神経芽腫では予後と関連した数個選別した。さらに、次世代シーケンサーにて変異検出を行なった。これでも、カテニン遺伝子等の変異は検出可能で、欠失に関してもロング PCR を用いた測定系でほぼ検出可能となった。

これらのマーカーの検出は、診断のみならず、

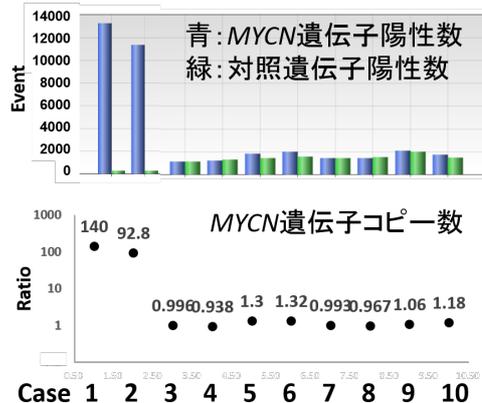


図2:cfDNAのデジタルPCRによるMYCN増幅

治療効果、再発のマーカーとしての有用性が示唆された。

4) CTC(循環腫瘍細胞)の検討： 担癌患者の全血から CD45 にて造血系細胞を除去し、さらにはがん幹細胞マーカーに対して磁気ビーズ抗体をつけて、購入した細胞濃縮装置 (IsoFluxx システム) を用いて濃縮分離採取した磁気ビーズ抗体による分離法を使用して CTC の豊富な分画を分離した。膀胱がん患者では、主にサイトケラチン抗体を用いた分離を、神経芽腫では GD2 抗体、他の小児がんでは CD133 等の抗体を用いた。さらに、保有する一細胞分離装置にて CTC を採取し、これらから上記 1, 2 のマーカーに一細胞解析を行い、遺伝子発現、遺伝子変異について検討した。PCA 解析によると、蛋白解析によるマス解析結果の PCA 解析では、明らか

に CTC レベルでも診断可能であり、さらに組織から直接分離した一細胞とも明らかに識別可能であった (図 3)

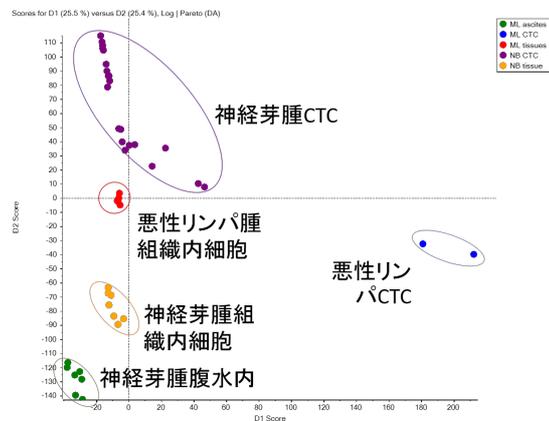


図 3 : CTC および組織由来細胞の PCA 解析

遺伝子変異、発現を確認するセロミクスでは神経芽腫、腎芽腫、リンパ腫は PCA 解析で分別可能で、ゲノミクスとともに侵襲の少ない診断ツールであり、薬剤反応性や再発探索にも有用なツールとなることが示唆された。がん幹細胞と関連した解糖系酵素のピークを CTC にて検討した結果、再発例や難治例でピークが検出され、これらは悪性度や治療抵抗性の指標となることが示された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

Nakamura H, Bono H, Hiyama K, Kawamoto T, Kato Y, Nakanishi T, Nishiyama M, Hiyama E, Hirohashi N, Sueoka E, Poellinger L, Tanimoto K, Differentiated embryo chondrocyte plays a crucial role in DNA damage response via transcriptional regulation under hypoxic conditions, PLOS ONE, 査読有, 13, 2018, e192136-e192136

DOI: 10.1371/journal.pone.0192136
Kumamoto S, Takahashi N, Nomura K, Fujiwara M, Kijioka M, Uno Y, Matsuda Y, Sotomaru Y, Kono T, Overexpression of microRNAs from the Gtl2-Rian locus contributes to postnatal death in mice. Hum Mol Genet, 査読有, 26, 2017, 3653-3662

DOI: 10.1093/hmg/ddx223
Honda S, Minato M, Suzuki H, Fujiyoshi M, Miyagi H, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka K, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A, Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma: Four novel tumor suppressor candidates, Cancer Science,

査読有, 107, 2016. 812-819
DOI: 10.1111/cas.12928
Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, Sueda T, Hiyama E, Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer, *British Journal of Cancer*, 査読有, 115, 2016, 59-65
DOI: 10.1038/bjc.2016.175
Yagyu S, Iehara T, Tanaka S, Gotoh T, Misawa-Furihata A, Sugimoto T, London W B, Hogarty M D, Teramukai S, Nakagawara A., Hiyama E, Maris J M, Hosoi H, Serum-Based Quantification of MYCN Gene Amplification in Young Patients with Neuroblastoma: Potential Utility as a Surrogate Biomarker for Neuroblastoma, *PLoS ONE*, 査読有, 11, 2016, e161039-e161039
DOI: 10.1371/journal.pone.0161039
Kawashima M, Kojima M, Ueda Y, Kurihara S, Hiyama E, Telomere biology including TERT rearrangements in neuroblastoma: a useful indicator for surgical treatments, *Journal of Pediatric Surgery*, 査読有, 51, 2016, 2080-2085
DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.042
Kanda M, Yamanaka H, Kojo S, Usui Y, Honda H, Sotomaru Y, Harada M, Taniguchi M, Suzuki N, Atsumi T, Wada H, Baghdadi M, Seino K, Transcriptional regulator Bhlhe40 works as a cofactor of T-bet in the regulation of IFN- γ production in iNKT cells, 査読有, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 2016, E3394-3402
DOI: 10.1073/pnas.1604178113
Niitsu H, Hinoi T, Kawaguchi Y, Sentani K, Yuge R, Kitadai Y, Sotomaru Y, Adachi T, Saito Y, Miguchi M, Kochi M, Sada H, Shimomura M, Oue N, Yasui W, Ohdan H. KRAS mutation leads to decreased expression of regulator of calcineurin 2, resulting in tumor proliferation in colorectal cancer. 査読有, *Oncogenesis*, 5, 2016, e253
DOI: 10.1038/oncsis.2016.47
Miguchi M, Hinoi T, Shimomura M, Adachi T, Saito Y, Niitsu H, Kochi M, Sada H, Sotomaru Y, Ikenoue T, Shigeyasu K, Tanakaya K, Kitadai Y, Sentani K, Oue N, Yasui W, Ohdan H, Gasdermin C Is Upregulated by Inactivation of Transforming Growth Factor Receptor Type II in the Presence of Mutated Apc, Promoting Colorectal Cancer Proliferation, 査読有, 11, 2016, e0166422

DOI: 10.1371/journal.pone.0166422
Sasamoto T, Fujimoto K, Kanawa M, Kimura J, Takeuchi J, Harada N, Goto N, Kawamoto T, Noshiro M, Suardita K, Tanne K, Kato Y, DEC2 is a negative regulator for the proliferation and differentiation of chondrocyte lineage-committed mesenchymal stem cells, *Int J Mol Med*, 査読有, 38, 2016, 876-884
DOI: 10.3892/ijmm
Kokoroishi K, Nakashima A, Doi S, Ueno T, Doi T, Yokoyama Y, Honda K, Kanawa M, Kato Y, Kohno N, Masaki T, High glucose promotes TGF- β 1 production by inducing FOS expression in human peritoneal mesothelial cells, *Clin Exp Nephrol*, 査読有, 20, 2016, 30-38
DOI: 10.1007/s10157-015-1128-9
Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Sueda T, Ohta E, Morihara N, Hirano S, Irisuna F, Hiyama E, Circulating free DNA as non-invasive diagnostic biomarker for childhood solid tumors, *Journal of Pediatric Surgery*, 査読有, 50, 2016, 2094-2097
DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2015.08.033.
Sasada T, Hinoi T, Saito Y, Adachi T, Takakura Y, Kawaguchi Y, Sotomaru Y, Sentani K, Oue N, Yasui W, Ohdan H, Chlorinated Water Modulates the Development of Colorectal Tumors with Chromosomal Instability and Gut Microbiota in Apc-Deficient Mice, *PLoS One*, 査読有, 10, 2015, e0132435
DOI: 10.1371/journal.pone.0132435
Fujii S, Fujimoto K, Goto N, Kanawa M, Kawamoto T, Pan H, Srivatanakul P, Rakdang W, Pornprasitwech J, Saskianti T, Suardita K, Nishimura F, Kato Y, Characteristic expression of MSX1, MSX2, TBX2 and ENTPD1 in dental pulp cells, *Free PMC Article*, 査読有, 3, 2015, 566-572
DOI: 10.3892.br2015.456
Hiyama E, Ali A, Amer S, Harada T, Shimamoto K, Furushima R, Abouleila Y, Emara S, Masujima T, Direct Lipido-Metabolomics of Single Floating Cells for Analysis of Circulating Tumor Cells by Live Single-cell Mass Spectrometry, *Analytical Sciences*, 査読有, 31, 2015, 1215-1217
DOI: 10.2116/analsci.31.1215

〔学会発表〕(計 32 件)

永江 玄太, 山本 尚吾, 辰野 健二, Claire Renard-Guillet, 梅田 高呂, 堤 修一, 藤田 征志, 中川 英刀, 榎山 英三, 油谷 浩幸, 肝芽腫の包括的

メチル化解析で明らかとなった予後不良に関連するメチル化サブタイプと癌特異的エンハンサー, 第 76 回日本癌学会学術集会, 2017 年

藤好 直, 本多 昌平, 湊 雅嗣, 鈴木拓, 檜山 英三, 武富 紹信, 肝芽腫におけるシスプラチン耐性関連遺伝子の異常高メチル化の同定, 第 76 回日本癌学会学術集会, 2017 年

山岡 絵美, 久保 陽子, 檜山 英三, DHRS3 と NROB1 は神経芽腫細胞株の分化と増殖抑制を誘導する, 第 76 回日本癌学会学術集会, 2017 年

Hiyama E, Kurihara S, Hirano S, Irisuna F, Ueda Y, Kawashima M, Integrated Genetic and Epigenetic Analysis novel Molecular Subgroups in Hepatoblastoma, The 49th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP2017), 2017 年

Kurihara S, Hiyama E, Ueda Y, The probability of liquid biopsy as non-invasive diagnostic tool for childhood solid tumors, 第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017 年

深澤 賢宏, 谷本 圭司, 山岡 絵美, 金輪 真佐美, 廣橋 伸之, 檜山 英三, 小児肝がん細胞において高発現する膜蛋白 ADAM32 の意義, 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年

本多 昌平, 宮城 久之, 檜山 英三, 武富 紹信, 肝芽腫において異常メチル化で発現抑制される PARP6 の機能解析, 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年

村上 義昭, 上村 健一郎, 橋本 泰司, 近藤 成, 中川 直哉, 末田 泰二郎, 檜山 英三, 膵癌患者における circulating tumor DNA の検出と予後, 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年

Hiyama E, Kawashima M, Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Hiyama K, Telomere biology in neuroblastoma: focusing on alteration of TERT promoter lesion, Advances in Neuroblastoma Research Congress (ANR) 2016, 2016 年

山岡 絵美, 林 陽子, 檜山 英三, 予後良好な神経芽細胞腫で発現していた 3 遺伝子の機能解, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年

山岡 絵美, 金輪 真佐美, 田川 浩美, 福場 郁子, 久保 陽子, 古屋敷 なぎさ, 平野 尚子, 深澤 賢宏, 檜山 英三, 神経芽腫細胞株における分化誘導候補因子の解析, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

Hiyama E, Kurihara S, Ueda Y, Kawashima M, Hiyama K, Cancer Fluid Biopsy Using Circulating Tumour Cells and

Circulating Free DNA in Childhood Solid Tumors, 48th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, 2016 年

外丸 祐介, 信清 麻子, 吉岡 みゆき, 畠山 照彦, 黒滝 陽子, 平川 玲子, 佐々木 えりか, 様々な核の組合せにより作製したマーマーセット 4 倍体胚の発生能について, 日本マーマーセット研究会, 2016 年

Hirata I, Veronica SR, Tania S, Yamauchi Y, Kanawa M, Kato Y, Kato K, Effect of Mesenchymal Stem Cells on Mixed Self Assembled Monolayer, The International Dental Materials Congress 2016, 2016 年

Hiyama E, Exome sequencing of hepatoblastoma identifies biological signatures and potential therapeutic targets, International Pediatric Liver Tumor Symposium, 2016 年

外丸 祐介, 畠山 照彦, 吉岡 みゆき, 信清 麻子, コモンマーマーセット凍結保存精子の運動性と体外受精能, 第 62 回日本実験動物学会総会, 2015 年

外丸 祐介, 信清 麻子, 吉岡 みゆき, 畠山 照彦, 印藤 頼子, 兼子 明久, 岡本 宗裕, 岡原 純子, 佐々木 えりか, 霊長類受精卵のガラス化保存, Cryopreservation Conference 2015, 2015 年

羽田野 直人, 村上 義昭, 上村 健一郎, 橋本 泰司, 近藤 成, 中川 直哉, 佐々木 勇人, 檜山 英三, 末田 泰二郎, Droplet Digital PCR を用いた膵癌 KRAS 遺伝子変異の研究, 第 115 回日本外科学会定期学術集会, 2015 年

Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Sueda T, Ohta E, Morihara N, Hirano S, Irisuna F, Hiyama E, Circulating free DNA as non-invasive diagnostic biomarker for childhood solid tumors, 48th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2015 年

Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Yano M, Que T, Iehara T, Hoshino K, Koh K, Tanaka Y, Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Mortality and morbidity in primarily resected hepatoblastomas in Japan: experience of JPLT (Japanese study group for pediatric liver tumor) trials, 48th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2015 年

②① 湊 雅嗣, 本多 昌平, 小林 希, 三次 早香, 鈴木 拓, 岡田 忠雄, 宮城 久之, 檜山 英三, 武富 紹信, CIAD2 は DNA メチル化により制御される肝芽腫の新規癌抑制遺伝子である, 第 52 回日本小児外科学会学術集会, 2015 年

②② 島本 和美, 檜山 英三, フローサイト

- メーターによる血中循環腫瘍細胞(CTC)の測定について(神経芽腫), 第25回日本サイトメトリー学会学術集会, 2015年
- ⑳ 島本 和美, 檜山 英三, シングルセル解析を目指した血中循環腫瘍細胞(CTC : Circulating Tumor Cells)の基礎的研究について, 第 74 回日本癌学会学術集会, 2015 年
- ㉑ Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Ueda Y, Morihara N, Fukuba I, Komatsu R, Integrated exome analysis in childhood hepatoblastoma: Biological approach for molecular targeting, S10P 2015, 2015 年
- ㉒ 檜山 英三, 小児肝がんに対するゲノム解析と国際共同臨床試験へのアプローチ, 第 53 回日本癌治療学会学術集会, 2015 年
- ㉓ 山岡 絵美, 金輪 真佐美, 田川 浩美, 福場 郁子, 久保-林 陽子, 古屋敷 なぎさ, 阿部 裕子, 平野 尚子, 檜山 英三, 予後良好な神経芽細胞腫で高発現していた DHR3, NROB1, CYP26A1 の機能解析, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年

〔図書〕(計 3 件)

- 檜山 英三, 医学書院, 標準小児外科学 第 7 版, 2017, pp.342-354
- 檜山 英三, 医薬ジャーナル社, よくわかる臨床研究 ~ 小児がん ~ 小児がん臨床研究プロトコルの実際「肝腫瘍」, 2016, pp.154-159
- 檜山 英三, 診断と治療社, 小児血液・腫瘍学, 2015, 536-540

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : 遺伝子の変異検出キット及び遺伝子の変異検出方法
 発明者 : 檜山 英三
 権利者 : 同上
 種類 : 特許
 番号 : 特願 2017-006625
 出願年月日 : 平成 29 年 1 月 18 日
 国内外の別 : 国内

取得状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕
 ホームページ等
 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜山 英三 (HIYAMA EISO)
 広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
 研究者番号 : 0 0 2 1 8 7 4 4

(2) 研究分担者

外丸 祐介 (SOTOMARU YUSUKE)
 広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
 研究者番号 : 9 0 3 0 9 3 5 2

金輪 真佐美 (KANAWA MASAMI)
 広島大学・自然科学研究支援開発センター・助教
 研究者番号 : 0 0 2 8 4 2 0 8

上田 祐華 (UEDA YUKA)
 広島大学・病院(医)・病院助教
 研究者番号 : 7 0 6 2 4 6 4 1

栗原 将 (KURIHARA SHO)
 広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・助教
 研究者番号 : 4 0 7 2 4 8 9 4

(3) 連携研究者

升島 努 (MASUJIMA TSUTOMU)
 理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー
 研究者番号 : 1 0 1 3 6 0 5 4